Klotho 在盐敏感性高血压肾损伤中的作用及分子机制研究

赵伟，唐荣杰，杨珊珊，等. 绿色通道 Klotho 在盐敏感性高血压肾损伤中的作用及分子机制研究［J］. 中国全科医学，2023. ［Epub ahead of print］. DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0010

赵伟[1,2]，唐荣杰[1,2]，杨珊珊[1,2]，杨芳[1]，孙锋[1]，廉秋芳[1,2*]

基金项目：国家自然科学基金项目（项目编号：82160090）；陕西省重点研发计划(项目编号：2021SF-396)；陕西省中医药科研项目（项目编号：2021-ZZ-JC042）

1. 712000 陕西省咸阳市，延安大学咸阳医院心血管内科
2. 716000 陕西省延安市，延安大学医学院
*通信作者：廉秋芳，副教授，硕士生导师；E-mail：wjylqf@163.com

【摘要】 **目的** 探讨讨 klotho 在盐敏感性高血压肾损伤中的作用及分子机制。**方法** 采用 NaCl 137mmol/L 和血管紧张素Ⅱ（Ang Ⅱ）10^{-6}mmol/L 共同诱导的 HBZY1 细胞损伤模型模拟盐敏感性高血压肾损伤，收集细胞。实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）与蛋白质印记法（Western Blot）检测 klotho mRNA 和蛋白表达的差异。构建 klotho 干扰载体和过表达载体与血管紧张素Ⅱ受体-1（AT1R）过表达载体，将构建的载体转染至细胞中并验证转染效率。转染成功后进行下列检测，细胞计数试剂-8（CCK-8）法检测细胞活力，流式细胞术检测细胞活性氧（ROS）含量，酶联免疫吸附测定（ELISA）法检测细胞上清液中丙二醛（MDA）与超氧化物歧化酶（SOD）含量，免疫共沉淀（Co-IP）检测 klotho 与 AT1R 相互作用的影响。**结果** 与对照组相比，造模组 klotho mRNA 和蛋白的表达下降（P＜0.05）。klotho-siRNA2 干扰效果最好；klotho 过表达组的 klotho 表达升高，AT1R 过表达组的 AT1R 表达升高，说明具有过表达效果。与对照组相比，造模组细胞活力下降，ROS 与 MDA 含量升高，SOD 含量减少（P＜0.05）；与造模组相比，klotho 过表达组的细胞活力升高，ROS 与 MDA 含量下降，SOD 含量减少（P＜0.05），而 klotho 干扰组的细胞活力进一步下降，ROS 与 MDA 含量进一步升高，SOD 含量进一步减少（P＜0.05）。与造模组相比，klotho 过表达组的细胞活力升高，ROS 与 MDA 含量下降，SOD 含量减少（P＜0.05），而 klotho+AT1R 过表达组的细胞活力下降，ROS 与 MDA 含量升高，SOD 含量减少（P＜0.05）。Co-IP 确定 klotho 与 AT1R 之间存在相互作用。**结论** klotho 通过与 AT1R 相互作用，抑制氧化应激损伤，从而在盐敏感性高血压肾损伤中发挥保护作用。

【关键词】 盐敏感性高血压；肾损伤；氧化应激；klotho；AT1R

The role and molecular mechanism of Klotho in salt-sensitive hypertensive renal injury

ZHAO Wei [1,2], TANG Rongjie [1,2], YANG Shanshan [1,2], YANG Fang[1], SUN Feng[1], LIAN Qiufang [1]
1. Department of Cardiology, Xianyang Hospital of Yan'an University, Xianyang 712000, China
2. Medical School of Yan'an University, Yan'an 716000, China
** Corresponding author：LIAN Qiufang, Associate professor, Master supervisor；E-mail：wjylqf@163.com*

【Abstract】 **Objective** To investigate the role of Klotho in salt-sensitive hypertensive renal injury and its molecular mechanism. **Methods** HBZY1 cell injury model induced by NaCl 137 mmol/L and AngII 10-6 mmol/L was used to simulate salt-sensitive hypertensive kidney injury, and cells were collected. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western Blot were used to detect the expression of Klotho mRNA and protein. The Klotho interference vector and overexpression vector were constructed, and the Angiotensinogen II receptor-1(AT1R) overexpression vector was transfected into cells. The transfection efficiency was verified by qRT-PCR and Western Blot. The following assays were performed after transfection. Cell proliferation activity was measured by CCK-8 assay, and ROS content was measured by Flow cytometry assay, the contents of malondialdehyde (MDA) and Superoxide dismutase superoxide dismutase (SOD) in the supernatant were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ,

and the interaction between Klotho and AT1R was detected by co-immunoprecipitation (Co-IP) . **Results** Compared with the control group, the expression of Klotho mRNA and protein decreased in the model group (P<0.05). The KLOTHO-SIRNA2 interference effect was the best, and the expression of Klotho in the Klotho overexpression group and AT1R in the AT1R overexpression group increased, indicating the overexpression effect. Compared with the control group, the cell viability of the model group was decreased, the contents of ROS and MDA were increased, and the contents of SOD were decreased (P<0.05), the content of SOD decreased (P<0.05) , but the activity of klotho-treated cells decreased further, the content of ROS and MDA increased further, and the content of SOD decreased further (P<0.05). Compared with the model group, the Klotho overexpression group had higher cell viability, lower ROS and MDA contents and lower SOD contents (P<0.05) , while the Klotho + AT1R overexpression group had lower cell viability, higher ROS and MDA contents, the content of SOD decreased (P<0.05). CO-IP determines the interaction between Klotho and AT1R. **Conclusion** Klotho plays a protective role in salt-sensitive hypertensive renal injury by inhibiting oxidative stress injury through interaction with AT1R.

【Keywords】 Salt-Sensitive Hypertensive; Kidney Injury; Oxidative Stress; Klotho; AT1R

盐作为高血压的重要易患因素，血压的盐敏感性是指在高盐摄入时血压呈现的一种升高反应，与此相关联的高血压类型称为盐敏感性高血压(salt-sensitive hypertension, SSH)[1]。调查显示，51%的高血压人群具有盐敏感性，并且 SSH 占我国高血压人群的 50%～60%[2]。此外，相较于原发性高血压，SSH 患者血管、心脏、肾脏等靶器官损伤的发病率更高，损伤程度更严重[3]。其中，盐敏感性高血压肾损伤是长期高盐负荷与血压控制不佳所致的共同结局，会迁延发展至慢性肾脏病（chronic kidney disease，CKD），甚至为终末期肾病。Klotho 作为一种抗衰老基因[4]，主要在肾脏中表达，其编码的分泌型蛋白（klotho 蛋白）可以激素样形式进入血液循环中发挥积极效应。研究发现，任何形式的肾损伤都会导致 klotho 表达下降，klotho 缺乏是 CKD 的早期表现，同时也加速 CKD 的进展[5]。目前，klotho 已作为一种评估 CKD 患者病情及预后的新型标志物，并在 CKD 治疗中发挥重要作用[6,7]。然而，迄今为止，klotho 在盐敏感性高血压肾损伤中的作用及分子机制的研究还未有报道。因此，本实验采用 NaCl 137mmol/L 和血管紧张素Ⅱ（Angiotensin Ⅱ，Ang II）10^{-6}mmol/L 共同诱导的 HBZY1 细胞损伤模型模拟盐敏感性高血压肾损伤，通过观察 klotho 对 HBZY1 细胞活性及相关生化指标的影响，阐明 klotho 在盐敏感性高血压肾损伤中的作用及分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞：大鼠肾小球系膜细胞株 HBZY1（Procell，货号：CL-0092）。

1.2 实验试剂和仪器：OPTI-MEM®，Trizon Reagent（康为世纪，货号：CW0580S）；Ultrapure RNA 超纯 RNA 提取试剂盒（康为世纪，货号：CW0581M）；HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)（Vazyme，货号：R223-01）；2×SYBR Green PCR Master Mix（Lifeint，货号：A4004M）；Reactive Oxygen Species Assay Kit（凯基生物，货号：KGT010-1100assays）；超氧化物歧化酶（SOD）ELISA 试剂盒（酶免，货号：MM-0386R2）；丙二醛（MDA）试剂盒（酶免，货号：MM-0385R2）；超敏发光液（赛默飞，货号：RJ239676）；PVDF 膜（Millipore，货号：IPVH00010）；内参一抗：Mouse Monoclonal Anti-GAPDH(中杉金桥，货号：TA-08，中杉金桥，1/2000)；二抗：辣根酶标记山羊抗鼠 IgG（H+L）(中杉金桥，货号：ZB-2305)；目的一抗：Rabbit Anti klotho(Santa Cruz,货号:sc-515942,1/1000);目的一抗:Rabbit Anti AT1R （Proteintech，货号：25343-1-AP，1/1000）；荧光 PCR 仪（伯乐生命医学产品（上海）有限公司，货号：CFX Connect™实时）；超高灵敏度化学发光成像系统（伯乐生命医学产品（上海）有限公司，货号：Chemi DocTM XRS+）；全自动化学发光图像分析系统（上海天能科技有限公司，货号：Tanon-5200）；NovoCyte™流式细胞仪（艾森生物（杭州）有限公司，货号：NovoCyte2060R）；全自动酶标仪（六一，货号：WD-2102B）。

1.3 细胞造模：采用 NaCl 137mmol/L 和 AngII 10^{-6} mmol/L 刺激 HBZY1 细胞 24h 建立细胞模型。

1.4 细胞转染：当细胞密度 70％时，更换培养基；取灭菌的 EP 管 2 个，每管加 125ulOpti-MEM，其中一管加入 5ul lipofectamine 3000，另一个 EP 管加入 2.5ug 质粒、5ul P3000，混匀后室温孵育 5min；将上述两个 EP 管混匀，室温孵育 15min，将混合液滴到六孔板中对应的孔内，将细胞放回孵箱培养；转染 4h 后在

六孔板中加入血清含量为20%的完全培养基 1ml；48h 后进行后续处理。
1.5 CCK-8 法：将转染后的细胞消化、重悬，计数，铺板，细胞密度为 7000 个/孔；待细胞贴壁后，24h 后将待测的 96 孔板细胞换成相同的培养基，每孔 100ul；每孔加入 10ul CCK8 试剂，置于培养箱中孵育 2h；酶标仪在 450nm 波长处检测每孔的吸光值。
1.6 流式细胞术：按照 1:1000 用无血清培养基稀释 DCFH-DA，是终浓度为 10 umol/l；弃去细胞培养液，向细胞中加入稀好的 DCFH-DA，37℃培养箱孵育 20 分钟；用无血清的培养液洗涤三次，以充分去除多余的未进入细胞的 DCFH-DA；加 1mlPBS 洗涤，1500rpm 离心 5min，弃上清；加 300ulPBS 重悬细胞后上机。
1.7 酶联免疫吸附测定（ELISA）法：从室温平衡 60min 后的铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回 4℃。设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50μL；样本孔中加入待测样本 50μL；空白孔不加。除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体 100μL，用封板膜封住反应孔，37℃水浴锅或恒温箱温育 60min。弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液（350μL），静置 1min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板 5 次。每孔加入底物 A、B 各 50μL，37℃避光孵育 15min。每孔加入终止液 50μL，15min 内，在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。
1.8 实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）：TrIzon 使样本充分裂解，提取 RNA 进行浓度、纯度测定，将 RNA 通过逆转录 HiFiScript cDNA 第一链合成试剂盒合成 cDNA，以 cDNA 为模板，在荧光定量 PCR 仪上进行检测，以β-actin 为内参，计算出各组细胞中 mRNA 的相对表达水平。其中反应体系包括：2×SYBR Green PCR Master Mix（10ul）、cDNA（1ul）、上游引物（0.4ul）、下游引物（0.4ul）、RNase Free ddH20（8.2ul）。klotho 引物上游 5′- ACTTTCTTCTGCCCTATTTCACG-3′，下游 5′- CCAGGTAATCGTTGTATTTTATCGG -3′，β-actin 引物上游 5′- GCCATGTACGTAGCCATCCA-3′，引物下游 5′-GAACCGCTCATTGCCGATAG-3′。
1.9 蛋白质印记法（Western Blot）：细胞加入裂解液，冰上放置 15min，12000 r/min 高速离心机离心 10 min，取上清液，加入缓冲溶液，煮沸 5min，-20℃保存。用 BCA 蛋质定量试剂盒检测细胞上清中蛋白质浓度，绘制标准曲线。制作 SDS-PAGE 胶，上样，开始跑胶，电泳 60V 压缩蛋白，80V 分离蛋白（120min），切好含有内参或目的条带的胶。依次放好海绵、滤纸、胶、膜、滤纸、海绵。用遇冷的 1×转膜液浸没目的胶带复合物，用 300mA 恒流转膜。用 1×TBST 配置 3%的脱脂牛奶封闭液，封闭 1h。将 PVDF 膜孵育一抗过夜。洗膜，用 1×TBST 浸泡 10 min 后弃掉，重复 3 次。将 PVDF 膜孵育二抗 2 小时。洗膜，用 1×TBST 浸泡 10 min 后弃掉，重复 3 次。用发光液浸湿 PVDF 膜后放置于超高灵敏度化学发光成像系统样品放置区运行程序显影成像。
2.0 免疫共沉淀（Co-Immunoprecipitation，Co-IP）：ODG 缓冲液裂解细胞后，BCA 法测定蛋白浓度，取等量的蛋白首先用 IgG 和 A/G 蛋白交联琼脂糖胶粒(protein A/G-plus agarose beads)预处理，然后用用 Klotho 抗体与琼脂糖胶粒孵育，最后取等量蛋白行凝胶电泳、转膜后再用相应的抗体进行检测。

2 统计学分析

各项实验至少进行 3 次独立平行实验，结果均以$\bar{x}\pm s$ 表示。数据分析及实验作图均采用 GraphPaid Prism 8.0 软件进行。两组间比较采用独立样本 t 检验（Independent two-samplet-test），多组间比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA）进行，组间多重比较采用 Tukey 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 NaCl 和 AngⅡ处理对 HBZY1 细胞中 klotho mRNA 和蛋白的影响 与对照组相比，造模组中 klotho 的 mRNA 与蛋白表达均下降，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。如图 1 所示。

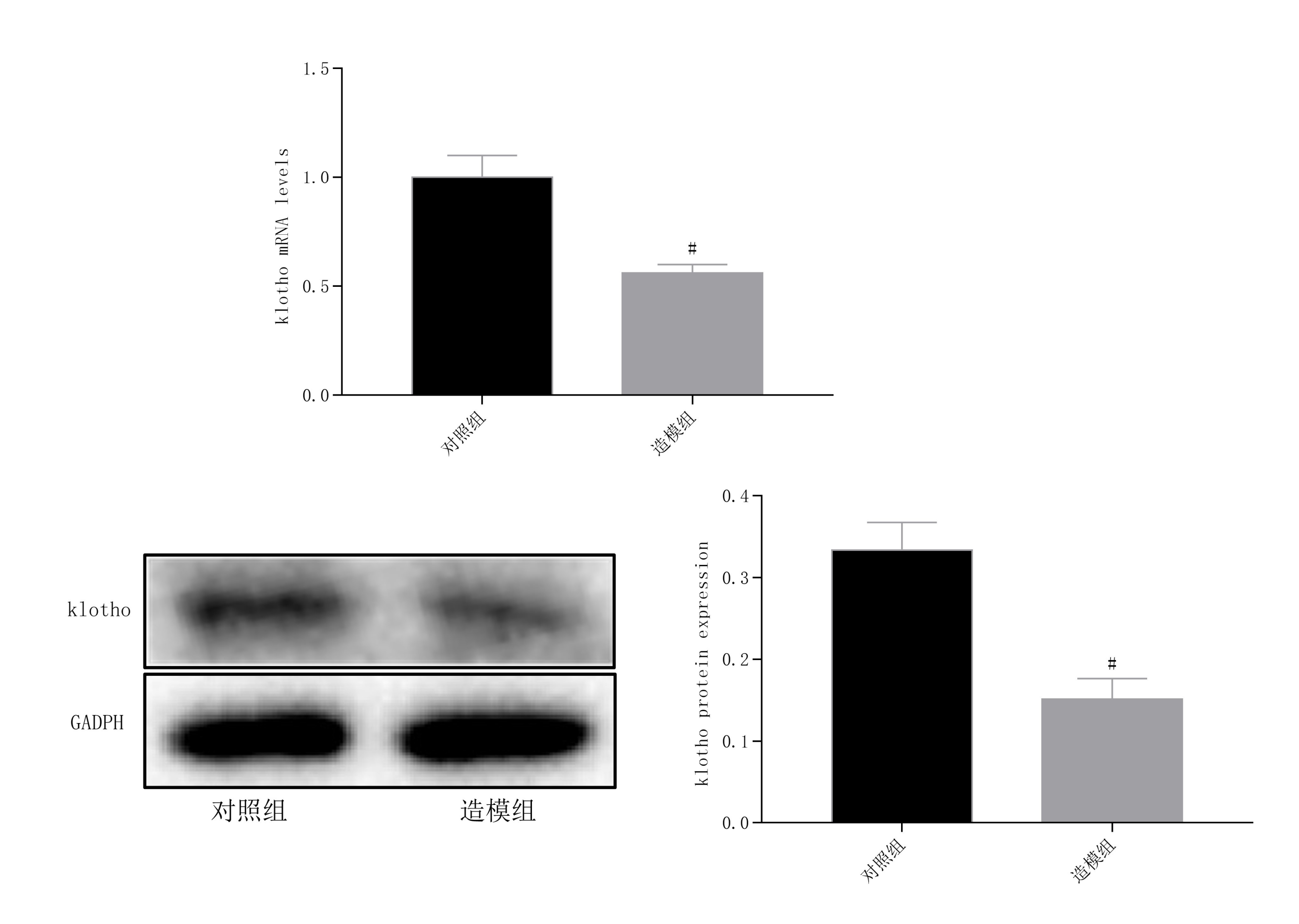
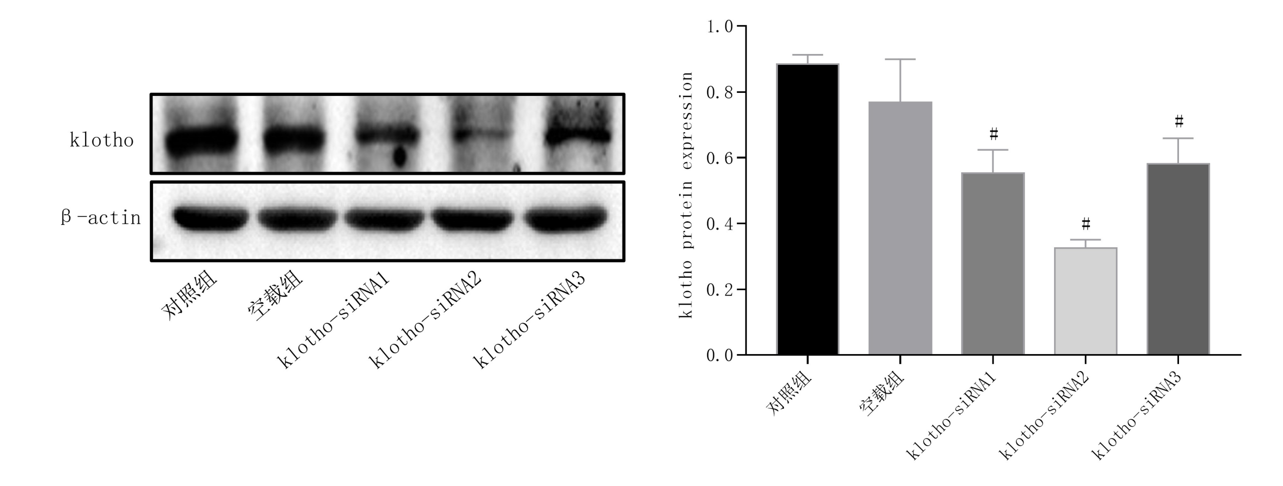


图 1 NaCl 和 AngⅡ处理对 HBZY1 细胞中 klotho mRNA 和蛋白的影响。与对照组相比，#代表 $P<0.05$。

3.2 klotho 干扰和过表达与 AT1R 过表达验证结果 与对照组相比，三条 klotho 干扰序列都具有干扰效果，其中 klotho-siRNA2 干扰效果最好（$P<0.05$）。此外，与对照组相比，klotho 过表达组的 klotho 表达明显升高，AT1R 过表达组的 AT1R 表达明显升高，说明具有过表达效果（$P<0.05$）。如图 2 所示。



klotho
β-actin
对照组 空载组 Klotho过表达组

klotho protein expression
1.0 0.8 0.6 0.4 0.2 0.0
#
对照组 空载组 klotho过表达组

AT1R
β-actin
对照组 空载组 AT1R过表达组

AT1R protein expression
1.5 1.0 0.5 0.0
#
对照组 空载组 AT1R过表达组

图 2 klotho 干扰和过表达与 AT1R 过表达验证结果。与对照组相比，#代表 $P<0.05$。

3.3 klotho 对细胞活力的影响 与对照组相比，造模组细胞活力下降（$P<0.05$）。与造模组相比，klotho 过表达组细胞活力升高，klotho 干扰组细胞活力进一步下降（$P<0.05$）。如图 3 所示。

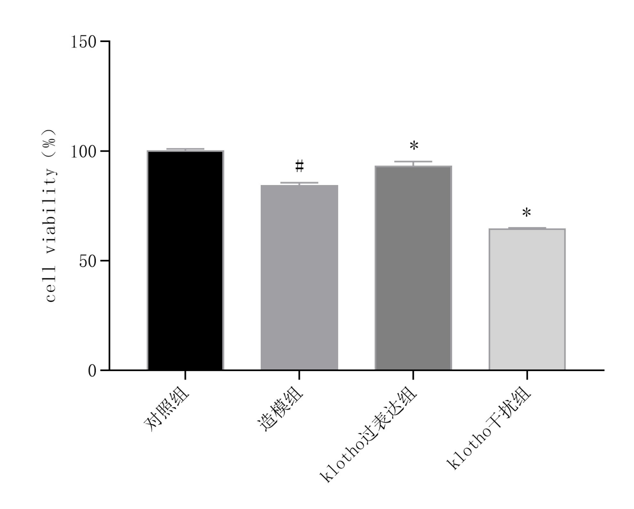


图 3 klotho 对细胞活力的影响。与对照组相比，#代表 $P<0.05$。与造模组相比，*代表 $P<0.05$。

3.4 klotho 对细胞氧化应激损伤的影响 与对照组相比，造模组细胞内 ROS、MDA 含量升高，SOD 含量下降（$P<0.05$）。与造模组相比，klotho 过表达组 ROS、MDA 含量下降，SOD 含量上升，而 klotho 干扰组 ROS、

MDA 含量进一步升高，SOD 活性进一步下降（$P<0.05$）。如图 4 所示。

图 4 klotho 对细胞氧化应激损伤的影响。与对照组相比，#代表 $P<0.05$。与造模组相比，*代表 $P<0.05$。

3.5 klotho 通过 AT1R 对细胞活力的影响 与造模组相比，klotho 过表达组细胞活力升高（$P<0.05$）。与 klotho 过表达组相比，klotho+AT1R 过表达组细胞活力下降（$P<0.05$）。如图 5 所示。

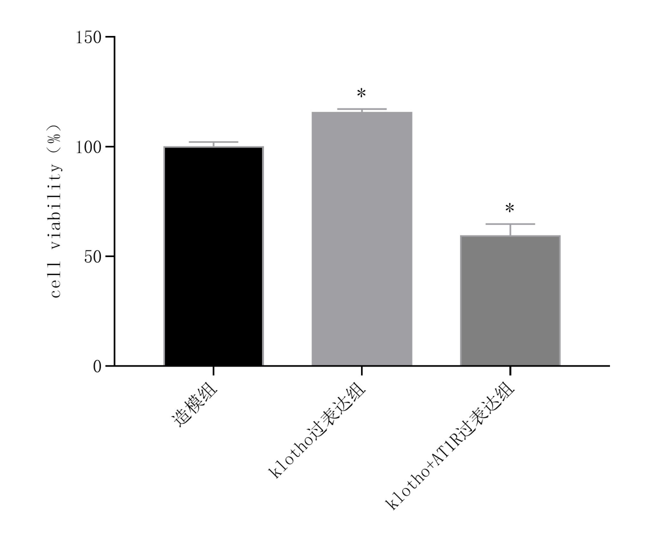


图 5 klotho 通过 AT1R 对细胞活力的影响。与造模组相比，*代表 $P<0.05$。

3.6 klotho 通过 AT1R 对细胞氧化应激损伤的影响 与造模组相比，klotho 过表达组细胞 ROS、MDA 含量下降，SOD 含量上升（$P<0.05$）。与 klotho 过表达组相比，klotho+AT1R 过表达组细胞 ROS、MDA 含量上升，SOD 含量下降，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。如图 6 所示。

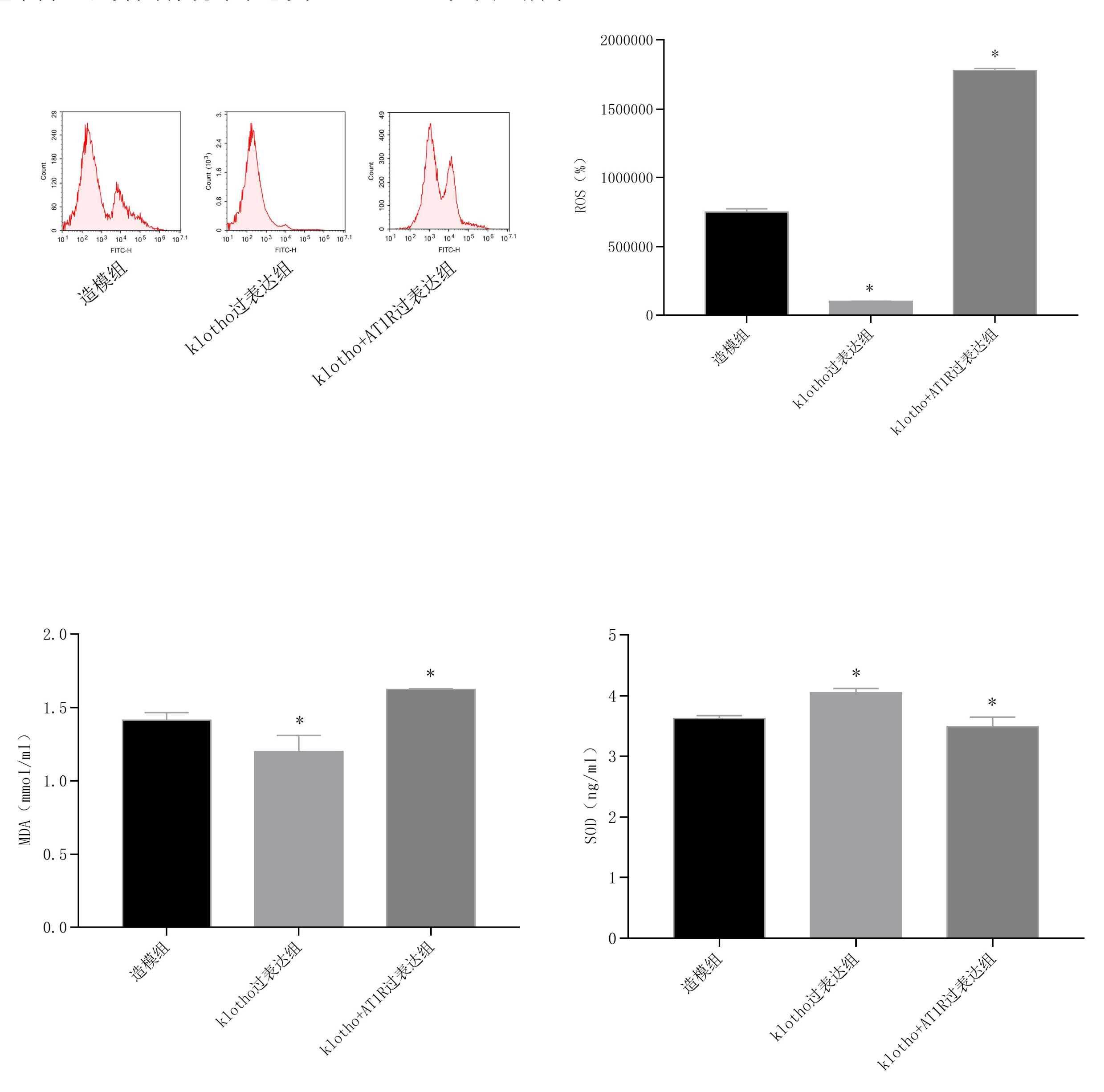


图 6 klotho 通过 AT1R 对细胞氧化应激损伤的影响。与造模组相比，*代表 $P<0.05$。

3.7 klotho 与 AT1R 相互作用 免疫共沉淀实验证明，用 klotho 抗体下拉后能检测到 AT1R 的表达，表明 klotho 和 AT1R 之间确实存在相互作用。如图 7 所示。

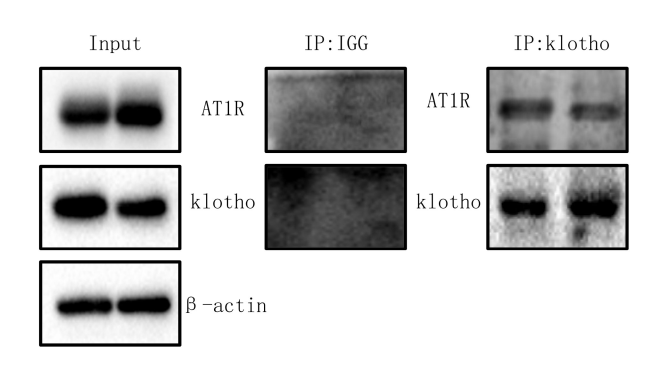


图 7 免疫共沉淀实验证明 klotho 与 AT1R 相互作用。

4 讨论

1997 年，Kuro-o 等人通过培育基因缺陷小鼠发现了一种抑制衰老的基因—klotho 基因，该实验发现，klotho 基因的缺失会引发一系列机体衰老退化的表现，如动脉钙化、骨质疏松、皮肤皱缩、生长迟缓、步态障碍、寿命缩短等[8]。最初的动物实验发现 klotho 主要在肾脏中表达，肾脏 Klotho 表达的消除使血液循环中 klotho 水平降低 80%，这与人体研究中所得结论一致[9]。近年来，在各种肾损伤模型的研究中[10]，包括阿霉素肾病模型、环孢霉素 A 肾病模型、多柔比星肾病模型、糖尿病肾病模型等均发现 klotho 表达下降。本研究发现，与对照组相比，造模组 klotho 蛋白与 mRNA 表达均显著下降，提示在盐敏感性高血压肾损伤中存在 klotho 表达下降，这与既往研究结论一致。

Klotho 参与机体多种病理生理反应，被认为是在机体衰老进程中的重要调节因素。Klotho 基因所编码的三种 klotho 蛋白，包括α-klotho、β-klotho、γ-klotho 蛋白都为膜结合性蛋白，其功能局限，主要是作为成纤维细胞生长因子的受体来发挥相应作用[11]。其中，α-klotho 在选择性切割酶的作用下产生一种截短的 klotho 蛋白，称为可溶性 klotho 蛋白[12]。研究发现，可溶性 klotho 蛋白具有抗炎、抗氧化、抗纤维化、调节钙磷代谢、调控血糖稳态等多种生物功能[13,14]。既往研究已证实 klotho 在肾损伤中的保护作用[15]。在腺嘌呤诱导的肾衰竭模型中[16]，klotho-siRNA 治疗加剧了肾纤维化的进展，同时导致假手术组小鼠中出现肾损伤，然而，外源性补充 klotho 逆转了上述现象。不仅如此，Hu 等人发现[17]，在肾脏缺血再灌注损伤诱导后给予 klotho 治疗可以减少α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）与 I 型胶原蛋白（I collagen）表达，抑制肾脏纤维化，减轻肾损伤，提示即使在肾损伤发生后，klotho 同样具有治疗潜力。本研究采用 klotho-siRNA 干扰与过表达手段来探讨 klotho 对 HBZY1 细胞活力的影响。发现与对照组相比，造模组细胞活力下降。与造模组相比，klotho 过表达组细胞活力升高，而 klotho 干扰组细胞活力进一步下降，提示 klotho 对肾脏细胞具有保护作用。Kimura 等发现[18]，过表达 klotho 的小鼠肾组织中 ROS 水平低，过氧化氢、SOD 等抗氧化酶活性高，而 klotho 缺陷小鼠 ROS 含量高，抗氧化酶活性低，表明 klotho 基因具有较强的抗氧化活性。本研究亦发现，与对照组相比，造模组细胞内 ROS、MDA 含量升高，SOD 含量下降。与造模组相比，klotho 组 ROS、MDA 含量下降，SOD 含量升高，而 klotho 干扰组细胞内 ROS、MDA 含量进一步升高，SOD 活性进一步下降。表明在 HBZY1 细胞中，klotho 可通过抑制氧化应激损伤来发挥保护作用。

Ang II 是氧化应激和 ROS 介导的信号传导的有效中介，Ang II 通过激活血管紧张素Ⅱ受体-1（Angiotensin Ⅱ receptor-1，AT1R）诱导 ROS 的产生。在高血压小鼠心肌纤维化中，通过阻断 AT1R 可明显抑制 AngⅡ诱导的心肌成纤维细胞 ROS 生成和胶原表达[19]。此外，在 Ang II 诱导的新生大鼠心肌细胞肥大的研究中，klotho 可显著抑制心肌细胞肥大，进一步研究表明，klotho 预处理显著下调 AT1R 蛋白表达，而不影响血管紧张素Ⅱ受体-2 蛋白表达[20]。本研究中，与造模组相比，klotho 干预后 ROS、MDA 含量下降，SOD 含量升高，细胞活力升高，而 AT1R 过表达后逆转了上述现象。不仅如此，Co-IP 实验确定 klotho 与 AT1R 之间存在相互作用。提示 klotho 通过与 AT1R 受体相互作用，抑制氧化应激损伤，从而发挥细胞保护作用。

综上所述，本文从细胞水平验证了 klotho 在盐敏感性高血压肾损伤中的保护作用，并从蛋白质与蛋白

质相互作用的角度，证明 klotho 通过与 AT1R 相互作用，抑制氧化应激损伤，从而发挥保护作用。后续我们计划在细胞实验中进一步探索 klotho 与 AT1R 之间的具体作用位点，并在动物实验中探讨 klotho 对盐敏感性高血压肾损伤的保护作用机制，为临床应用及药物研发提供更加充分的理论依据。

作者贡献：赵伟进行文章的构思与设计，结果的分析与解释及撰写论文；杨珊珊、唐荣杰进行细胞实验；孙锋进行数据整理；廉秋芳进行论文的修订；杨芳负责文章的质量控制及审校；廉秋芳对文章整体负责，监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

[1] 牟建军,任珂宇. 盐敏感性高血压的诊断和机制[J]. 诊断学理论与实践,2012,06:543-546.

[2] Wang Z, Chen Z, Zhang L, et al. Status of Hypertension in China: Results From the China Hypertension Survey, 2012-2015. Circulation. 2018;137(22):2344-2356.

[3] 赵营营. 健脾渗湿利水方治疗盐敏感性高血压痰湿中阻证的临床研究[D].山东中医药大学,2019.

[4] Xia J, Cao W. Epigenetic modifications of Klotho expression in kidney diseases. J Mol Med (Berl). 2021;99(5):581-592.

[5] Neyra JA, Hu MC. Potential application of klotho in human chronic kidney disease. Bone. 2017;100:41-49.

[6] 杨江信,熊加川,杨可,赵景宏. 血清 Klotho 水平与慢性肾脏病 3～5 期患者肾功能进展的关系[J]. 第三军医大学学报,2020,02:154-161.

[7] Franco ML, Beyerstedt S, Rangel ÉB. Klotho and Mesenchymal Stem Cells: A Review on Cell and Gene Therapy for Chronic Kidney Disease and Acute Kidney Disease. Pharmaceutics. 2021;14(1):11. Published 2021 Dec 21.

[8] Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. Nature. 1997;390(6655):45-51.

[9] Kakareko K, Rydzewska-Rosolowska A, Brzosko S, et al. The effect of nephrectomy on Klotho, FGF-23 and bone metabolism. Int Urol Nephrol. 2017;49(4):681-688.

[10]Mencke R, Olauson H, Hillebrands JL. Effects of Klotho on fibrosis and cancer: A renal focus on mechanisms and therapeutic strategies. Adv Drug Deliv Rev. 2017;121:85-100.

[11]Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. Annu Rev Physiol. 2013;75:503-533.

[12]Lu X, Hu MC. Klotho/FGF23 Axis in Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease. Kidney Dis (Basel). 2017;3(1):15-23.

[13]阎红伶,邱轩,陈雅洁,孟怡媚,刘宽芝. Klotho 与慢性肾脏病研究进展[J]. 中国临床医生杂志,2022,03:274-276.

[14]Buchanan S, Combet E, Stenvinkel P, Shiels PG. Klotho, Aging, and the Failing Kidney. Front Endocrinol (Lausanne). 2020;11:560. Published 2020 Aug 27.

[15]赵颖丹,郭志勇. Klotho 蛋白与肾脏疾病的研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2017,07:652-655.

[16]Zhang Q, Liu L, Lin W, et al. Rhein reverses Klotho repression via promoter demethylation and protects against kidney and bone injuries in mice with chronic kidney disease. Kidney Int. 2017;91(1):144-156.

[17]Hu MC, Shi M, Gillings N, et al. Recombinant α-Klotho may be prophylactic and therapeutic for acute to chronic kidney disease progression and uremic cardiomyopathy. Kidney Int. 2017;91(5):1104-1114.

[18]Kimura T, Shiizaki K, Akimoto T, et al. The impact of preserved Klotho gene expression on

antioxidative stress activity in healthy kidney. Am J Physiol Renal Physiol. 2018;315(2):F345-F352.

[19]Chen P, Yang F, Wang W, et al. Liraglutide Attenuates Myocardial Fibrosis via Inhibition of AT1R-Mediated ROS Production in Hypertensive Mice. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2021;26(2):179-188.

[20]Yu L, Meng W, Ding J, Cheng M. Klotho inhibits angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy through suppression of the AT1R/beta catenin pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2016;473(2):455-461.